

氏 名 ・ (本籍)	齋藤 芳太郎 (秋田県)
専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	医博甲第 928 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Novel method for rapid in-situ hybridization of HER2 using non-contact alternating-current electric-field mixing (電界非接触攪拌技術を応用した rapid in situ hybridization の開発)
論文審査委員	(主査) 教授 後藤 明輝 (副査) 教授 廣川 誠 教授 寺田 幸弘

学 位 論 文 内 容 要 旨

論 文 題 目

Novel method for rapid in-situ hybridization of HER2 using non-contact alternating-current electric-field mixing.

(論文題目の和訳)

電界非接触攪拌技術を応用した rapid in situ hybridization の開発

申請者氏名 齋藤 芳太郎

研 究 目 的

乳癌には様々なサブタイプがあり、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)受容体などが存在する。特に、HER2 受容体の増幅の有無は、トラスツマブなどの分子標的薬の適応に関わり、その予後を著明に延長することが知られている。HER2 遺伝子の増幅の有無は免疫組織化学染色(Immunohistchemistry：IHC)で蛋白の発現を間接的に評価するか、もしくは in situ hybridization (ISH)で直接的に判定されている。通常は短時間染色が可能でコストも低い IHC 法を行い、0/1+(陰性)、2+(equivocal)、3+(陽性)と判断する。しかし、IHC は細胞膜の染色程度で診断するため、定性的判定に留まる。2+症例のみを ISH を用いて、より詳細に評価するが、ISH は HER2/CEP17 比を算出して評価を行うため定量的判定が可能である。しかし、hybridization に要する時間が 18 時間必要であり全工程に 2 日間要する。さらに高価な機器を用いるため、多くの施設では検査を外部委託に頼らざるを得ない。そのため結果の判定に数週間かかることもあり、進行癌患者の治療開始の遅れにつながり、待機中に癌の進行をきたして治療が困難な状態まで進行することがある。そこで我々は、乳癌の ISH に電界非接触攪拌技術を応用し、hybridization に要する時間を 3 時間以内に短縮する rapid in situ hybridization(RISH)法を開発した。

研 究 方 法

本研究では、2012 年 4 月から、2014 年 3 月まで、乳癌に対し生検、もしくは手術治療を受けた 163 例に対して、従来法の用手染色による DISH、全自動免疫染色装置(automated slide stainer; ASS)を用いた DISH、RISH を行い、それぞれの整合性を検討した。

本研究に用いられている電界非接触攪拌法は我々で確立した技術であり、その原理は静置した液体を電極に挟み、低周波電界を印加して水分子を共振させることで液を攪拌させる技術である。この技術により、通常約 2 時間を要する免疫組織染色の全工程が、30 分に短縮できる。そのため、肺癌、脳神経腫瘍などの分野で、通常 HE 染色のみで行われている術中迅速病理診断の精度を格段に上昇することが可能となった。同染色過程では低周波電圧を加える

ことで、免疫組織染色の抗原抗体反応を促進させているが、この技術を DNA プローブと一本鎖化された DNA への反応、すなわち ISH に応用して検査時間の短縮に成功した。本研究で hybridizaiton を 3 時間に短縮したことにより、全工程を 6 時間以内に終了することが可能となった。

研 究 成 績

163 例は全て IHC 染色により評価され、HER2 検査ガイドラインに従って 0、1+、2+、3+に分類し、0/1+は陰性、2+は equivocal、3+は陽性と判断された。0 は 36 例で、DISH、RISH、ASS DISH すべてで陰性を示した。1+は 41 例あり、DISH 法では 1 例評価不能であったが、他は全て陰性を示した。2+は 59 例あり、DISH 法では 55 例が陰性、1 例が陽性、3 例が評価不能であった。RISH は 56 例が陰性、3 例が陽性を示した。ASS DISH は 54 例が陰性、3 例が陽性であったが、2 例が評価不能であった。3+は 27 例存在し、DISH は陰性 2 例、陽性 25 例と偽陰性を認めた。RISH、ASS DISH は 27 例全例が陽性を示した。RISH と DISH の一致率は 95.7%(Cohen kappa coefficient= 0.859, 95% confidence interval (CI): 0.760-0.958)と高い一致率を示し、また RISH と ASS DISH も一致率 98.8%(Cohen kappa coefficient= 0.960, 95% CI 0.906-1.000)と非常に高い一致率を示した。

結 論

通常 24 時間程度要する DISH の全工程を、RISH は 6 時間以内に終了することを可能とした。また、従来法の DISH と比較し高い一致率を示し、RISH は実臨床応用可能と考える。

学位(博士一甲) 論文審査結果の要旨

主 査： 後藤 明輝

申請者： 齋藤 芳太郎

論文題名： Novel method for rapid in-situ hybridization of HER2 using non-contact alternating-current electric-field mixing.

要旨

著者の研究は、乳癌に対して行われている HER2 遺伝子増幅の有無に対して行う検査である遺伝子プローブ法(in-situ hybridization: ISH)を迅速化する、新しいプロトコルを検討したものである。HER2 遺伝子増幅は乳癌の予後規定因子であり、分子標的薬治療の適応が決定されるが、ISH は論文内容用紙に示されるように長時間を要するという欠点がある。著者の論文では、この問題点を電解非接触攪拌技術によって短縮化し、解決している。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下のとおりである。

1) 斬新さ

HER2 遺伝子に関しての検査は、免疫組織染色(immunohistochemical staining: IHC)、もしくは ISH によって判定される。IHC は定性的評価にとどまる一方、ISH は定量的な評価ができるためより客観性に優れている。しかし、ISH は IHC と比較して、高額的全自動免疫染色装置を用いる上、染色に長時間を要し、また試薬コストが高いという問題点がある。このため、現在は、HER2 遺伝子に対してまず IHC を行い、IHC で境界型と判定された症例に対してのみ ISH が行われ、より正確性が高い ISH が最初から行われることは稀であった。著者は ISH に長時間を要するという問題点を解決するため、ISH の工程に行われている、hybridization と抗原抗体反応に対して電解非接触攪拌技術という新しい技術を用い短縮化を図った。電解非接触攪拌技術は秋田大学と秋田産業技術センターが合同で開発した技術で、その原理は、静置した液体を電極に挟み、低周波電解を印加して水分子を共振させることで液を攪拌し、通常 1 時間要する抗原抗体反応を 2 分程度に短縮した。著者の論文においては、この技術を hybridization に対して用い、hybridization に要する時間を 18 時間から 3 時間まで短縮し、通常 24 時間程度かかる全工程を 6 時間以内に可能とし、電解非接触攪拌技術が ISH に応用可能であることを初めて示した。また、その過程で極少量の DNA プローブの

蒸発を防ぐため、プローブを超低粘度のオイルカバーで覆い電解非接触攪拌技術を行う方法を開発し、この技術を、「電解攪拌を用いた生体分子の迅速検出法」として特許出願している。

2) 重要性

これまでの ISH は全工程に約 2 日が必要であり、外注検査に頼っていたため結果が判明するまで数週間を要するのが現状であった。著者は、6 時間以内に検査の全工程を終了し、検査の同一日の結果判定を可能としたため、進行癌患者の速やかな治療介入が可能なことを示した。さらに、1 枚当たりの染色時間を短縮したことから、医療経済の点でも時間コストの削減に寄与しており重要であると考ええる。

3) 実験方法の正確性

電解非接触攪拌技術は、著者らが開発し、すでに市販された技術を用いている。著者は、ISH に対する新しいプロトコルを確立し、過去三年間の 163 標本を染色し、既存の染色法や、通常臨床で幅広く使用されている全自動免疫染色装置で染色された ISH 標本と結果を比較検討している。統計学的に高い一致性を認めており、客観的な評価法を行い正確性があると考えられる。

4) 表現の明瞭さ

これまでの ISH 問題の解決を行うため、研究目的、方法、実験結果、考察を簡潔、明瞭に記載していると考ええる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。